

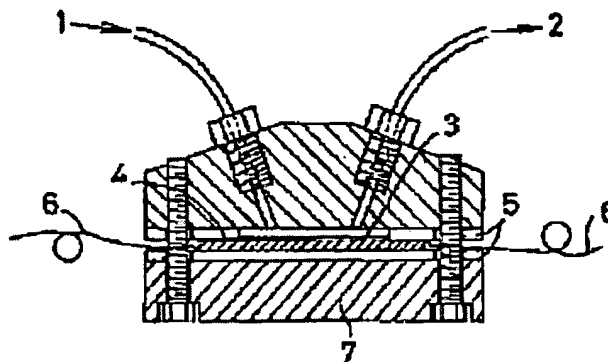
MEASUREMENT OF HUMAN SERUM ALBUMIN

Patent number: JP7260782
Publication date: 1995-10-13
Inventor: YAMAZOE NOBORU; others: 01
Applicant: SHIONOGI & CO LTD
Classification:
- international: G01N33/53; G01N33/543
- european:
Application number: JP19940074240 19940317
Priority number(s):

Abstract of JP7260782

PURPOSE: To provide a means useful for the early diagnosis of diabetic nephropathy detecting a very small amt. of human serum albumin(HSA) excreted in urine as a marker by enabling the simple and rapid measurement of a very small amt. of HSA, especially, a very small amt. of HSA in urine.

CONSTITUTION: Human serum albumin(HSA) in a soln. to be examined is bonded to an immobilized antibody using a quartz vibration type sensor using an AT cut element fitted with a metal electrode as a quartz vibrator 4 and having an anti-human serum albumin antibody (anti-HSA antibody) adsorbed and immobilized on its electrode. Other anti-HSA antibody is further bonded to bonded HSA and, subsequently, vibration frequency is measured.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-260782

(43)公開日 平成7年(1995)10月13日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	D			
33/543	5 9 3			

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平6-74240

(22)出願日 平成6年(1994)3月17日

(71)出願人 000001926

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72)発明者 山添 昇

福岡県春日市松ヶ丘4-32

(72)発明者 三浦 則雄

福岡県福岡市中央区平尾3-17-5-307

(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 ヒト血清アルブミンの測定方法

(57)【要約】

【構成】金属電極付きのATカット素子を水晶振動子とし、この電極に抗ヒト血清アルブミン抗体(抗HSA抗体)を吸着固定化させた水晶振動式センサーを用いて被検液中のヒト血清アルブミン(HSA)を該固定化抗体に結合させ、結合したHSAにさらに他の抗HSA抗体を結合させ、次いで振動数を測定することを特徴とするヒト血清アルブミンの測定方法。

【効果】本発明の測定方法により、微量のHSA、特に尿中の微量のHSAを簡易かつ迅速に測定することが可能となる。したがって、尿中に排泄される微量のヒト血清アルブミン(HSA)をマーカーとして検出する糖尿病性腎症の早期診断のための有用な手段を提供することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属電極付きのATカット素子を水晶振動子とし、この電極に抗ヒト血清アルブミン抗体（抗HSA抗体）を吸着固定化させた水晶振動式センサーを用いて被検液中のヒト血清アルブミン（HSA）を該固定化抗体に結合させ、結合したHSAにさらに他の抗HSA抗体を結合させ、次いで振動数を測定することを特徴とするヒト血清アルブミンの測定方法。

【請求項2】 金属電極に吸着固定化される抗HSA抗体がHSAに対するモノクローナル抗体である請求項1記載の方法。

【請求項3】 HSAにさらに結合させる他の抗HSA抗体が、HSAに対するポリクローナル抗体である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 モノクローナル抗体を50～80℃に加熱処理することを特徴とする請求項2または3に記載の方法。

【請求項5】 金属電極が金電極である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微量のヒト血清アルブミンの高感度測定方法に関する。さらに詳しくは、水晶振動式ヒト血清アルブミンセンサーを用いる微量アルブミンの高感度測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】水晶振動子は、近年、その表面質量変化に対する発振周波数変化が注目され、多くの溶液中の物質の分析に応用されてきている。最近では、その表面に抗体を固定化して各種抗原物質の検出に利用する試みがなされている（Muramatsu et al., Anal. Chimi. Acta, vol. 188, 257(1986)、Davis et al., Anal. Chem., vol. 61, 1227 (1989)）。

【0003】糖尿病性腎症の早期診断には、尿中に排泄される微量のヒト血清アルブミン（HSA）をマーカーとして検出することが有効とされている。従来、HSA濃度の測定は、放射免疫測定法（RIA）や酵素免疫測定法（EIA）等により行われているが、これらの方法では、ラベル化した抗体や抗原を用いる必要があり、操作が煩雑であり、さらに測定時間が長いなどの難点がある。

【0004】一方、水晶振動子を用いるHSAの検出については、これまでに数例の報告がある（Prusak-Sochaczewski およびJ. H. T. Luong, Anal. Lett., vol. 23, 401 (1990)、M. Muratsugu et al., Anal. Chem., vol. 65, 2933 (1993)）が、未だ感度や繰り返し応答性の改善が望まれているのが実情である。

【0005】そこで、本発明者らは、水晶振動子を用いる微量HSAの検出法において、表面質量変化をさらに

2

増大させることにより、発振周波数変化を増幅し、検出感度の向上を図る方法を鋭意検討したところ、水晶振動子として金属電極付きのATカット素子を用い、この電極に抗HSA抗体を吸着固定化させた水晶振動式センサーを用いるHSA測定方法において、HSAを含む溶液を流してHSAを選択的に該固定化抗体に結合させた後に直ちに振動数の変化を測定するのではなく、HSAを結合させた後さらに抗HSA抗体を含む溶液を流してこのHSAをサンドイッチ状に挟んで抗HSA抗体を結合させた後に振動数の変化を測定すると、HSA結合後に測定する場合に比べて検出感度が顕著に向上することを発見した。本発明は、この発見に基づきさらに研究を進めて完成させたものである。

【0006】すなわち、本発明の目的は、水晶振動子として金属電極付きのATカット素子を用い、この電極に抗HSA抗体を吸着固定化させた水晶振動式センサーを用いる、HSAの高感度測定方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明の要旨は、（1） 金属電極付きのATカット素子を水晶振動子とし、この電極に抗ヒト血清アルブミン抗体（抗HSA抗体）を吸着固定化させた水晶振動式センサーを用いて被検液中のヒト血清アルブミン（HSA）を該固定化抗体に結合させ、結合したHSAにさらに他の抗HSA抗体を結合させ、次いで振動数を測定することを特徴とするヒト血清アルブミンの測定方法、（2） 金属電極に吸着固定化される抗HSA抗体がHSAに対するモノクローナル抗体である前記（1）記載の方法、（3） HSAにさらに結合させる他の抗HSA抗体が、HSAに対するポリクローナル抗体である前記（1）または（2）に記載の方法、（4） モノクローナル抗体を50～80℃に加熱処理することを特徴とする前記（2）または（3）に記載の方法、（5） 金属電極が金電極である前記（1）～（4）のいずれか1項に記載の方法、に関する。

【0008】本発明に用いられる金属電極付きのATカット素子を水晶振動子とする水晶振動式センサーを用いる振動数測定装置としては、公知のもの、例えば特開平3-115947号公報に開示されているものが挙げられる。しかし、図1に示すような、フローセルタイプのものがより好適に使用し得る。即ち、水晶振動子の片面（抗体を固定化した側）のみが流通する溶液に接触するように水晶振動子をフローセルに組み込んだタイプであり、溶液を流通させた状態で発振させる。

【0009】水晶振動子としては、ATカット、振動周波数5～10MHzのものが好ましい。電極としては、金電極、銀電極、白金黒電極等各種のものが挙げられるが、抗HSA抗体を吸着固定化させる本発明の方法においては、測定精度の再現性等の観点から金電極が好まし

い。

【0010】金電極への抗HSA抗体の固定化法としては、プロテインAを介する方法、2-メルカプトエチルアミンを介する方法、 γ -アミノプロピルトリエトキシシランを介する方法等が挙げられるが、いずれも固定化量、周波数における応答感度、固定化された抗HSA抗体の安定性、繰り返し使用等のいずれかの観点で十分満足すべきものではなく、直接吸着固定化させる方法が最も優れている。

【0011】直接吸着固定化法は、金属電極へ抗HSA抗体の溶液を滴下し乾燥させる方法である。具体的には、例えば、金電極(80mm²)へ、50~3000ppmの抗HSA抗体のPBS(+0.1%Na₂S₂O₃、pH7.2)溶液10 μ lを滴下し、乾燥させることにより行なわれる。この方法により、抗HSA抗体の疎水性に富むFc部分が金表面と疎水結合することにより、吸着固定化されるものと思われる。

【0012】この乾燥は室温で行なってもよいが、50~80℃に約5~60分間加熱すると、抗HSA抗体の比較的変性し易いFc部分のみが変性して疎水結合し易くなり、一方、抗原認識部位であるFv部分は変性を受けないため、HSAに対する感度が向上する場合もある。

【0013】本発明に用いられる固定化用の抗HSA抗体としては、HSAに対するマウス、ウサギ、ヤギ等のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が挙げられるが、中でも、感度、応答再現性等の点から、例えば、マウスのHSAモノクローナル抗体(シグマ社、ザイメット社製、日本バイオテスト研究所製、セダレーン社製等)が特に好ましい。これは、HSAモノクローナル抗体が均一であるため、金電極への結合強度にばらつきが小さく、またHSAとの結合が強固かつ均一であることによる。

【0014】水晶振動子の表面質量を増大させるために、トラップされたHSAにさらに他の抗HSA抗体を結合させるが、このような抗HSA抗体としては、ポリクローナル抗体(例えば、シグマ社、コスモバイオ社)が好ましい。これは、トラップされたHSAの未反応サイトと結合することが要求されるため、モノクローナル抗体よりも多様な抗体を含むポリクローナル抗体のほうが対応し易く、結合の効率が高いためと思われる。

【0015】水晶振動式HSAセンサを用いて微量のHSAを測定するには、図1に示すようなフローセルに、上記のようにして抗HSA抗体を固定化した水晶振動子を組み込み、水晶振動子の片面だけにHSAを含む被検液を流通させた状態で発振させる。セルの内容積は、微量測定の場合は通常0.01~0.5cm³、溶液の流速は0.1~1.0ml \cdot min⁻¹程度が好ましい。センサ信号としては、抗原抗体反応に伴う水晶振動子の重量変化による共振周波数の変化量を周波数カウンターに

より室温で測定する。循環流通させるサンプル溶液(HSAを含む溶液)、ポリクローナル抗体溶液は通常1mlである。HSAやポリクローナル抗体はリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)(PBS)を用いる。また、測定後にHSAとモノクローナル抗体との結合を解離するには、pH3.0のリン酸水素二ナトリウム-クエン酸緩衝液を用いる。

【0016】本発明の測定法の原理は、次のとおりである。まず、モノクローナル抗体を固定化した水晶振動子にPBSを流通し、得られる安定した周波数をF₀とする。これに、HSA溶液を流通すると、固定化されたモノクローナル抗体とHSAとの間で抗原抗体反応が起こり、水晶振動子表面の重量が増加するため周波数がF₁まで減少する。この際の周波数減少量を $\Delta F_1 = (F_0 - F_1)$ とする。その後、ポリクローナル抗体溶液を流通すると、モノクローナル抗体と結合したHSAの未反応サイトにさらにポリクローナル抗体が結合することにより、周波数がF₂にまで減少する。従って、本発明の測定方法の感度は、 $\Delta F_1 = (F_0 - F_1)$ と $\Delta F_2 = (F_0 - F_2)$ の2種類で表され、F₁-F₂がポリクローナル抗体によって増幅された感度となる。2段階目の応答(F₁-F₂)は、固定化した抗体に結合したHSAの量に比例すると考えられるので、HSAの測定感度を増加させることができる。

【0017】

【実施例】以下、実施例および比較例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなら限定されるものではない。

実施例1

水晶振動子として、基本振動数6MHzの金電極付きのATカット素子を用いた。抗体の固定化は、金電極上に抗HSAモノクローナル抗体溶液(500ppm)を10 μ l滴下し、50℃において乾燥させることにより行った。この素子を図1に示すフローセルに組み込み、素子の片面だけにキャリア溶液を流通させた状態で発振させた。セルの内容積は0.05cm³、溶液の流速は、0.44ml \cdot min⁻¹とした。まず、PBS溶液1mlを循環流通させ安定したところで共振周波数(F₀)を測定した。次いで、15ppmのHSAを含むPBS溶液1mlを循環流通させ、安定したところで共振周波数(F₁)を測定した。さらに、1000ppmのHSAに対するポリクローナル抗体溶液1mlを循環流通させ、安定したところで共振周波数(F₂)を測定した。その結果を図2に示す。まず、15ppmのHSAの流通により100Hz程度の周波数の減少という応答が見られ、次に1000ppmのポリクローナル抗体を流通させることにより周波数がさらに減少し、全体で約300Hz以上の感度が得られた。

【0018】実施例2

実施例1において使用した水晶振動子を再使用するた

め、測定後のフローセルにPBSを循環流通させて洗浄した後、pH3.0のリン酸水素二ナトリウム-クエン酸緩衝液を循環流通させた。次いで、PBSを循環流通させながら共振周波数を測定したところ、図2に示すように、共振周波数は測定前のレベルにまで回復した。従って、本発明の方法によれば、同一固定化水晶振動子を繰り返し使用することが可能である。事実、この固定化水晶振動子は、4日間に100ppmのHSAに対する応答を約30回繰り返しても、安定した感度が得られた。

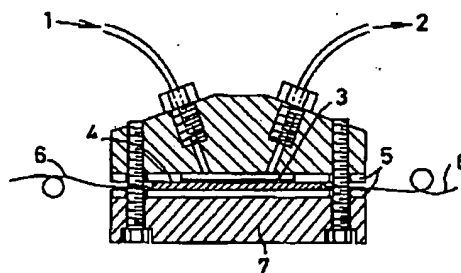
【0019】実施例3

実施例1および実施例2と同様にして、各種濃度のHSA溶液について共振周波数を測定し、 ΔF_1 および ΔF_2 を求めた。その結果を図3に示す。HSA濃度が0～20ppmの範囲で、HSA濃度は ΔF_1 または ΔF_2 のいずれとも比例関係が成立することが分かる。また、1ppm当たりの ΔF_1 が約6Hzであるのに対し、 ΔF_2 については約20Hzであり、ポリクローナル抗体のさらなる付加により、感度が約3倍以上増幅されたことが分かる。なお、ヒトの尿中のHSA濃度は、正常値が約10ppmであり、本発明の測定方法は糖尿病性腎症の早期診断に適しているといえる。

【0020】比較例

HSAの代わりにウシ血清アルブミン(BSA)を循環流通させ、実施例1と同様にして共振周波数を測定した。実験した1000ppmまで共振周波数の変化はみられなかった。

【図1】



【0021】

【発明の効果】本発明の測定方法により、微量のHSA、特に尿中の微量のHSAを簡易かつ迅速に測定することが可能となる。したがって、尿中に排泄される微量のヒト血清アルブミン(HSA)をマーカーとして検出する糖尿病性腎症の早期診断のための有用な手段を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の測定方法に使用される水晶振動式HSAセンサ用のフローセルの断面図の1例を示すものである。

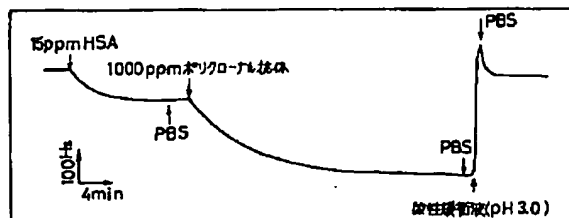
【図2】図2は、HSA溶液、ついでポリクローナル抗体溶液を流通させた場合のセンサの周波数応答を示す図である。また測定後に酸性緩衝液を流通させた場合の周波数の回復をも示す。

【図3】図3は、各種HSA濃度の溶液を流通させた場合に得られる周波数減少量(ΔF_1 および ΔF_2)とHSA濃度との相関関係を示す図である。

【符号の説明】

- 1 サンプル溶液入口
- 2 サンプル溶液出口
- 3 金電極
- 4 水晶振動子
- 5 シリコンラバーシート
- 6 銅リード線
- 7 アクリル樹脂

【図2】



【図3】

